

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/75665 A1(51) Classification internationale des brevets:
G01N 33/569, C07K 14/18, A61K 39/12, 48/00, 39/395(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine,
F-75008 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01620

(22) Date de dépôt international: 9 juin 2000 (09.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07290 9 juin 1999 (09.06.1999) FR
99/07361 10 juin 1999 (10.06.1999) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): IN-
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux,
F-75724 Paris Cedex 15 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): FLA-
MAND, Marie [FR/FR]; 20, rue Philibert-Lucot, F-75013
Paris (FR). MEGRET, Françoise [FR/FR]; 14, rue
Fantin Latour, F-75016 Paris (FR). ALCON, Sophie
[FR/FR]; 35, allée Montpensier, F-93190 Livry-Gargan
(FR). TALARMIN, Antoine [FR/FR]; Institut Pasteur,
28, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR).
DESPRES, Philippe [FR/FR]; 18, place de la Liberté,
F-92250 Garenne-Colombes (FR). DEUBEL, Vincent
[FR/FR]; 29, boulevard du Lycée, F-92170 Vanves (FR).(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.
- Avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: EARLY DETECTION OF FLAVIVIRUSES USING THE NS1 GLYCOPROTEIN

(54) Titre: DETECTION PRECOCE DES FLAVIVIRUS EN UTILISANT LA GLYCOPROTEINE NS1

(57) Abstract: The invention concerns a method for early detection of a flavivirus-induced infection, comprising the detection of the flavivirus non-structural glycoprotein NS1 in a biological sample during the clinical phase of the infection, by an immunological method using at least two identical or different antibodies, the first antibody consisting of polyclonal or monoclonal antibodies pre-selected for their high affinity for said NS1 protein hexameric in shape.

(57) Abrégé: Méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, comprenant la détection de la glycoprotéine non-structurale NS1 d'un flavivirus dans un échantillon biologique, pendant la phase clinique de l'infection, par une méthode immunologique mettant en oeuvre au moins deux anticorps identiques ou différents, le premier anticorps étant constitué par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux préalablement sélectionnés pour leur affinité élevée pour ladite protéine NS1 de forme hexamérique.



WO 00/75665 A1

DETECTION PRECOCE DES FLAVIVIRUS EN UTILISANT LA GLYCOPROTEINE NS1

La présente invention est relative à une méthode de détection précoce des flavivirus, notamment du virus de la dengue et à ses applications.

5 La dengue est une maladie tropicale aiguë fébrile dont le virus causal est un arbovirus, transmis par des moustiques. Les vecteurs de la maladie sont des moustiques du genre *Aedes*, notamment *Aedes aegypti* dont les gîtes larvaires sont le plus souvent domestiques et péri-domestiques. Le virus responsable, isolé en 1951, a été classé en quatre types antigéniques différents (DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4). Il
10 appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre flavivirus.

Plus de deux milliards d'habitants vivent dans les zones endémiques et le nombre d'individus infectés par le virus s'élèverait à plus de 100 millions par an. La dengue est notamment responsable de 500 000 hospitalisations et de plusieurs dizaines de milliers de décès annuels, des enfants, pour la plupart.

15 Après une incubation de cinq à huit jours, le début des signes cliniques est généralement soudain et consiste en l'apparition de fièvre non différenciée (DF *dengue fever*) accompagnée de céphalées sévères, de lombalgies, de douleurs musculaires et articulaires ainsi que de frissons. Du troisième au cinquième jour de phase fébrile, peut apparaître une éruption maculo-papuleuse congestive durant
20 trois à quatre jours (dengue classique).

Dans sa forme sévère, l'infection peut aboutir à l'apparition d'un syndrome hémorragique (DHF ou *dengue haemorrhagic fever*), caractérisé par une perméabilité vasculaire accrue et un dérèglement de l'hémostase. Alors que dans la majorité des cas, l'évolution est généralement favorable en une semaine, l'issue de la
25 maladie peut être fatale en cas de choc hypovolémique (DSS ou *dengue shock syndrome*). Ces complications pourraient être dues à la présence d'une immunité pré-existante, acquise notamment lors d'une primo-infection par un virus hétérologue de la dengue (sérotypage différent). En effet, deux types différents de réponse sérologique sont identifiés chez les sujets infectés par la dengue : les individus qui n'ont jamais eu une
30 infection à flavivirus et n'ont pas été vaccinés contre un autre flavivirus (virus de la fièvre jaune, virus de l'encéphalite japonaise par exemple) vont présenter une réponse

primaire, caractérisée par une apparition lente des anticorps spécifiques du virus responsable de l'infection ; les individus qui ont déjà eu une infection à flavivirus (autre sérotype de la dengue, par exemple) ou ont été vaccinés contre un autre flavivirus vont présenter une réponse secondaire, caractérisée par une apparition
5 rapide des anticorps.

L'agent infectieux est le virus de la dengue appartenant à la famille des *Flaviviridae*, à laquelle appartiennent également le virus de la fièvre jaune et celui de l'encéphalite japonaise (T.P. Monath et al., (1996) *Flaviviruses* in B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howly et al. (eds.) "Fields Virology" Philadelphia : Lippincott
10 Raven Press Publishers). Ces virus possèdent un ARN monocaténaire de polarité positive qui comprend 11000 nucléotides et qui code pour une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés. Elle s'individualise en trois protéines de structure et sept protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5, au cours de clivages co- et post-traductionnels par des protéases virales et cellulaires. La protéine
15 non structurale NS1 a été identifiée pour la première fois en 1970 par P.K. Russel et al. (*J. immunol.*, (1970), 105, 838-845) et caractérisée en 1985 par G.W. Smith et al. (*J. Gen Virol.*, (1985), 66, 559-571). Cette glycoprotéine hautement conservée dans le genre des flavivirus (T.P. Monath déjà cité), notamment dans les quatre sérotypes du virus de la dengue, existe sous une forme intracellulaire, et sous une forme
20 extracellulaire. La forme intracellulaire interviendrait dans les phases précoces de la réplication du virus (Hall R. A. et al., *J. Virol.* (1999), 73, 10272-10280 ; Rice C. M. et al. , *J. Virol.*, (1997), 71, 291-298 ; Rice C. M. et al., *J. Virol.*, (1996), 222, 159-168 ; Rice C. M. et al., *J. Virol.*, (1997), 71, 9608-9617). Avant d'être transportée vers la membrane plasmique, la protéine NS1 subit une dimérisation. Dans les cellules de
25 mammifères, mais pas dans les cellules d'insectes, une partie de la protéine NS1 est libérée dans le milieu extracellulaire soit majoritairement sous forme d'une protéine soluble, soit accessoirement sous forme microparticulaire. Lorsqu'elle est sous forme soluble, la protéine existe sous forme d'un oligomère, notamment d'un pentamère ou d'un hexamère (Crooks A.J. et al. *J. Chrom.* (1990), 502, 59-68 et *J. Gen. Virol.*
30 (1994), 75, 3453-3460). A l'heure actuelle la fonction biologique de la protéine NS1 n'est pas connue.

Plusieurs études suggèrent un caractère immunodominant de la protéine NS1 dans la réponse immunitaire protectrice contre les infections à flavivirus. Des expériences réalisées avec un certain nombre de flavivirus tels que les virus de la fièvre jaune, de la dengue, de l'encéphalite japonaise et de l'encéphalite à tique ont
5 montré une protection partielle ou totale contre une dose mortelle de virus homologue chez les animaux vaccinés à l'aide de la protéine NS1 sous-unitaire ou produite par des virus vecteurs, type vaccine ou adénovirus (Schlesinger *et al.*, *J. Virol* (1986), 60, 1153-1155 ; *J. Gen. Virol.*, (1987), 68, 853-857; Falgout *et al.*, *J. Virol.*, (1990), 64, 4356-4363 ; Jacobs *et al.*, *J. Virol.*, (1992), 66, 2086-2095; Hall *et al.*, *J. Gen. Virol.*,
10 (1996), 77, 1287-1294 ; Konishi *et al.*, *Virology*, (1991), 185, 401-410).

L'immunisation passive de souris par des anticorps monoclonaux anti-NS1 a également permis d'obtenir un certain degré de protection (Schlesinger *et al.*, *J. Immunol.* (1985), 135, 2805-2809 ; Gould *et al.*, *J. Gen. Virol.*, (1986), 67, 591-595; Henchal *et al.*, *J. Gen. Virol.*, (1988), 69, 2101-2107). On ne connaît pas
15 totalement le rôle des anticorps anti-NS1 dans la protection. Il se pourrait que les protéines NS1 à la surface des cellules infectées soient reconnues par les anticorps fixant le complément conduisant à la lyse des cellules infectées, (Schlesinger *et al.*, *Virology*, (1993), 192, 132-141).

Il n'existe pas de traitement spécifique et les soins apportés au
20 patient sont uniquement symptomatiques. Dans le cas de la dengue classique, le traitement repose sur l'administration d'antalgiques et d'antipyrétiques. Dans le cas de DHF, le traitement consiste en une perfusion pour compenser la fuite plasmatique, associée à la correction des troubles hydroélectriques et la relance de la diurèse.

Il n'existe pas de vaccin commercialisé contre le virus de la dengue.
25 En revanche des essais de protection par des souches atténuées des 4 sérotypes du virus de la dengue ont été effectués par N. Bhamarapravati *et al.* (*Dengue and Dengue haemorrhagic fever* (1997), 367-377) avec des résultats non satisfaisants. La prévention repose donc uniquement sur la lutte contre le vecteur. Cette lutte associe une destruction larvaire et des pulvérisations "adulticides".

30 En l'absence de vaccin, il est nécessaire de surveiller les épidémies et prévenir les complications précitées ; pour ce faire, des programmes de surveillance

active ont notamment été mis en place par l'Organisation Mondiale de la Santé et comprennent essentiellement la surveillance des cas de fièvre et des insectes vecteurs et le dépistage sérologique et virologique des personnes présentant une fièvre et suspectées être infectées par le virus de la dengue.

5 L'étiologie de la dengue est parfois délicate à affirmer lorsqu'un malade présente un syndrome fébrile indifférencié type " dengue-like " qui peut avoir comme origine un autre arbovirus, des virus provoquant des fièvres éruptives telle que la grippe ou des pathogènes non-viraux agents de maladies telles que la leptospirose et même le paludisme. Seul un examen de laboratoire peut apporter le diagnostic.

10 Il existe à l'heure actuelle plusieurs tests de diagnostic de la dengue. Toutefois, pour arriver à un résultat interprétable, il est nécessaire de combiner plusieurs méthodes :

- l'isolement du virus, par des techniques de virologie classique, notamment par infection de cultures de cellules ou propagation en cerveau de
15 sourceaux ou amplification par inoculation aux moustiques et examen par exemple par immunofluorescence. Ces méthodes ont l'inconvénient d'être difficiles à mettre en œuvre et de dépendre de la précocité du prélèvement et de bonnes conditions de conservation ; de plus, les premiers résultats ne peuvent être obtenus en moins d'une semaine ; pour pallier à ces inconvénients, on peut avoir recours à un test par
20 RT/PCR (V. Deubel, *L'eurobiologiste* (1997), tome XXXI, 37-155) ; toutefois, ce moyen n'est pas toujours fiable, et ne peut pas être utilisé en routine dans les pays concernés par l'infection par le virus de la dengue pour des raisons de coût et d'équipement ;

- les tests sérologiques ; le diagnostic sérologique le plus précoce
25 consiste à rechercher des IgM spécifiques des antigènes viraux par la technique MAC-ELISA (*immunoglobulin M Antibody Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Leur détection plusieurs jours après le début des symptômes permet d'établir un diagnostic de probabilité d'infection par un flavivirus. Les anticorps de type IgG apparaissent plus tardivement que les anticorps de type IgM. Dans tous les cas, la
30 recherche des anticorps nécessite deux prélèvements : l'un au début des signes

cliniques, l'autre 10 à 28 jours après, de façon à mettre en évidence une conversion sérologique par réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ou par ELISA.

Il a également été proposé des tests immunologiques simples et peu chers, utilisables dans les pays à risque, qui mettent en œuvre, comme réactif immunologique spécifique des peptides dérivés de la protéine non structurale NS1 caractéristique des flavivirus. Ainsi, le brevet US 5 824 506 décrit une méthode utilisant des peptides dérivés de la protéine non structurale NS1, qui permet de détecter les anticorps induits par la présence du virus de la dengue ; toutefois les peptides sélectionnés reconnaissent essentiellement les échantillons obtenus à partir de sujets convalescents et reconnaissent également mieux les patients infectés pour la seconde fois que ceux infectés pour la première fois ; ces résultats décevants pourraient s'expliquer par le fait que les peptides utilisés ne sont pas représentatifs des caractéristiques antigéniques de la protéine native et donc conduisent à une mauvaise reconnaissance des anticorps recherchés.

Dans tous les cas, seule la confirmation tardive d'une infection par un flavivirus peut être apportée.

Un rapport émanant du *Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre Royal Children's Hospital*, (A. Falconar, 1991) décrit la recherche de la glycoprotéine non structurale NS1 dans le sérum de patients infectés par le virus DEN2. Les auteurs de ce rapport ont mis au point un test ELISA de type double sandwich, dans lequel un sérum de lapin contenant des anticorps polyclonaux anti-NS1, utilisé comme anticorps de capture, est immobilisé sur une plaque de microtitration. L'antigène capturé est détecté à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine NS1 soit du virus de la dengue de type DEN2, soit spécifique du complexe sérologique de la dengue; la révélation de la formation du complexe antigène/anticorps est effectuée à l'aide d'IgG de chèvre anti-souris conjuguées à la peroxydase. Par cette méthode, les Auteurs ont montré qu'en utilisant de la protéine NS1 dimérique purifiée ou dégradée comme standard, la sensibilité de détection du test est d'environ 4 ng/ml avec les anticorps monoclonaux DEN2 comme sonde de révélation et d'environ 60 ng/ml avec les anticorps monoclonaux de groupe.

Toutefois, ce test ne permet de détecter la protéine NS1 ni dans les cas d'infections primaires en phase aiguë ou convalescente, ni dans les infections secondaires en phase convalescente dans lesquelles il existe un titre élevé en anticorps anti-NS1 ; les Auteurs en ont conclu que la protéine NS1 devait être présente en quantités importantes uniquement dans les cas d'infections secondaires et ce, de manière transitoire, pendant l'infection.

Or, les Inventeurs ont mis au point un procédé de purification de la protéine NS1 d'un flavivirus sous forme hexamérique, ce qui leur a permis de sélectionner des anticorps spécifiques de cette protéine sous forme hexamérique, et montrer de manière surprenante que ces anticorps sont des outils de choix pour la mise en évidence des différentes formes de la protéine NS1 circulante dans le cadre d'une infection par un flavivirus, en particulier dans les phases précoces où la réponse en anticorps spécifiques est indétectable, notamment lors des infections primaires par le virus de la dengue.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à une méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, qui répond mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'état antérieur de la technique, c'est-à-dire un procédé qui soit fiable, rapide, peu coûteux et qui permet d'adapter à temps les soins médicaux.

La présente invention a en conséquence pour objet une méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, caractérisée en ce qu'elle comprend la détection de la glycoprotéine non structurale NS1 d'un flavivirus dans un échantillon biologique, pendant toute la durée de la phase clinique de l'infection, par une méthode immunologique mettant en œuvre au moins deux anticorps identiques ou différents,

- le premier anticorps ou anticorps de capture de la glycoprotéine NS1 étant constitué par des anticorps choisis dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux préalablement sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, et
- des mélanges d'anticorps monoclonaux anti-NS1 préalablement sélectionnés pour leur affinité élevée pour la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés,

- le deuxième anticorps ou anticorps de révélation étant choisi dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine NS1 de forme hexamérique, et
- 5 - un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine NS1 de forme hexamérique.

Au sens de la présente invention, on entend par forme hexamérique de la protéine NS1 d'un flavivirus, la protéine native obtenue à partir du surnageant de culture de cellules de mammifères infectées par ledit flavivirus ou bien transformées
10 par un système d'expression comportant le gène de la protéine NS1 dudit flavivirus, et purifiée selon le procédé de l'invention tel que décrit ci-après. Cette forme hexamérique de ladite protéine NS1 qui se distingue d'autres formes telles que la forme monomérique ou la forme dimérique de ladite protéine, est mise en évidence par des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie telles que celles décrites à
15 la figure 1.

Au sens de la présente invention, on entend par anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre la protéine NS1 d'un flavivirus, des anticorps obtenus par immunisation d'un mammifère non humain,

- soit par une protéine NS1 de forme hexamérique,
 - 20 - soit par un flavivirus vivant ou inactivé,
- lesdits anticorps polyclonaux étant sélectionnés pour leur affinité pour la protéine NS1 sous forme hexamérique et purifiés en une seule étape et lesdits anticorps monoclonaux étant préalablement sélectionnés pour leur affinité élevée pour la protéine NS1 sous forme hexamérique puis purifiés par des techniques classiques,
25 notamment par chromatographie d'affinité ou échange d'ions.

Au sens de la présente invention on entend par affinité d'un anticorps monoclonal pour la protéine NS1 sous forme hexamérique la concentration en ladite protéine nécessaire pour saturer 50 % des sites de l'anticorps, celle-ci est mesurée par la constante d'affinité dudit anticorps selon le protocole décrit à
30 l'exemple 5.

Au sens de la présente invention on entend par affinité élevée une affinité dont la constante est inférieure à 10^{-8} M

De manière surprenante, l'utilisation, pour la détection de la protéine NS1 dans un échantillon biologique, d'anticorps polyclonaux sélectionnés et purifiés par immunocapture sur la protéine NS1 de forme hexamérique, ou d'anticorps monoclonaux présentant une affinité élevée pour la protéine NS1 de forme hexamérique et purifiés, en lieu et place d'un sérum total de lapin hyperimmunisé, permet d'améliorer de manière significative la sensibilité de la méthode et de mettre en évidence la protéine NS1 circulant dans le sang des malades, dès le stade précoce de l'infection, aussi bien lors d'une infection primaire que d'une infection secondaire.

La méthode selon la présente invention possède un certain nombre d'avantages :

- elle peut être mise en œuvre de manière précoce : la présence de la glycoprotéine NS1 est révélée lors de la phase clinique, avant que la réponse en anticorps ne soit détectable,
- elle est sensible : on peut détecter jusqu'à moins de 1 ng de protéine/ml de sérum, ce qui permet de détecter la protéine NS1 circulante dans la phase précoce des infections primaires,
- elle est rapide : on peut obtenir une réponse dans la journée,
- elle est relativement peu coûteuse et peut donc être utilisée dans les pays à risque,
- elle permet de distinguer les personnes vaccinées des personnes infectées récemment par un flavivirus puisque la protéine NS1 sera absente chez les personnes vaccinées chez lesquelles les anticorps pourraient encore être décelables.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode l'infection flavivirale est une infection par le virus de la dengue.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode, le premier anticorps est de préférence fixé sur un support solide convenable et le deuxième anticorps est éventuellement conjugué à un marqueur approprié.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode, lorsque le deuxième anticorps n'est pas conjugué à un marqueur, sa liaison à

la protéine NS1 fixée sur le support solide est alors détectée par un troisième anticorps conjugué à un marqueur convenable, ledit troisième anticorps étant un anticorps classiquement utilisé, tel que par exemple une IgG dirigée contre le deuxième anticorps et produite notamment chez la chèvre, le porc ou l'âne.

5 Parmi les marqueurs utilisés, on peut citer à titre d'exemple les marqueurs fluorescents, le système biotine/streptavidine, les marqueurs non isotopiques ou des enzymes, comme par exemple la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline.

 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite
10 méthode, ledit troisième anticorps est conjugué à une enzyme.

 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode,

 - le premier anticorps ou anticorps de capture est constitué par des anticorps polyclonaux de souris, sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1
15 du virus de la dengue, ladite protéine étant sous forme hexamérique, et

 - le deuxième anticorps ou anticorps de détection de la présence de NS1 dans l'échantillon biologique à analyser, est constitué par des anticorps polyclonaux de lapin immunisé par de la protéine NS1 du virus de la dengue, ladite protéine étant sous forme hexamérique, la fixation dudit deuxième anticorps étant
20 révélé par un troisième anticorps constitué par des anticorps, conjugués à la peroxydase et dirigés contre le deuxième anticorps.

 Selon un autre mode de mise en œuvre encore plus avantageux de ladite méthode, les anticorps polyclonaux de souris sont purifiés par immunocapture sur de la protéine NS1 hexamérique de dengue de sérotype 1.

25 La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic d'une infection flavivirale, caractérisé en ce qu'il comprend :

 - au moins un anticorps de capture et au moins un anticorps de révélation tels que définis précédemment,

 - au moins un contrôle positif constitué par la protéine NS1 d'un
30 flavivirus et/ou de différents sérotypes selon le flavivirus, ladite protéine, étant sous forme hexamérique, et

- au moins un contrôle négatif constitué par un sérum humain normal.

Selon un mode de réalisation avantageux du coffret de diagnostic selon l'invention, ladite protéine NS1 sous forme hexamérique est obtenue à partir
5 d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer tout ou partie de la protéine NS1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du coffret de
10 diagnostic selon l'invention, la protéine NS1 est celle du virus de la dengue.

Selon un autre mode de réalisation encore plus avantageux dudit coffret de diagnostic, le plasmide est le plasmide pCIneo-NS1.FGA qui a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2220, en date du 7 juin 1999.

15 La présente invention a également pour objet un procédé de purification de la protéine NS1 d'un flavivirus, sous forme hexamérique, à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 d'un flavivirus ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome
20 flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer la protéine NS1 sous forme hexamérique, caractérisé en ce que préalablement à la purification de la protéine NS1 par des techniques classiques telles que la chromatographie d'affinité, l'on sépare la forme soluble de la protéine NS1 de la forme microparticulaire de ladite protéine, par traitement par un agent précipitant puis par centrifugation.

25 Par exemple, la centrifugation est réalisée à une vitesse supérieure ou égale à 10 000 g.

Au sens de la présente invention, on entend par agent précipitant, un agent qui précipite spécifiquement les protéines microparticulaires ou débris cellulaires, comme par exemple le polyéthylèneglycol, ledit agent étant utilisé dans des
30 conditions classiques qui permettent de séparer des protéines solubles et des protéines microparticulaires ou débris cellulaires.

Dans un mode préféré de mise en œuvre dudit procédé de purification, la protéine hexamérique NS1 est celle du virus de la dengue, notamment le virus de la dengue de sérotype 1.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif la protéine NS1 d'un flavivirus, de forme hexamérique, éventuellement associée à d'autres protéines, en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans un mode préféré de réalisation de la composition immunogène selon la présente invention, la composition immunogène comprend au moins un mélange des protéines NS1 de forme hexamérique correspondant aux différents sérotypes du virus de la dengue.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif sélectionné dans le groupe constitué par :

- un polynucléotide capable d'exprimer tout ou partie de la protéine NS1 du virus de la dengue quel que soit son sérotype,

- un système d'expression comprenant au moins un promoteur capable de faire exprimer chez l'hôte où il est injecté, un ADN codant pour la protéine NS1 du virus de la dengue quel que soit son sérotype, ledit ADN exprimant ladite protéine,

en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Des protocoles de vaccination utilisant des acides nucléiques sont notamment décrits dans la demande internationale WO 90/11092.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine NS1 de forme hexamérique d'un flavivirus ou d'un de ses systèmes d'expression, pour la préparation d'une composition immunogène capable d'induire la production d'anticorps *in vivo*.

Dans un mode préféré de ladite utilisation, la protéine NS1 est celle du virus de la dengue, notamment de sérotype 1.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps monoclonal anti-NS1 présentant une affinité élevée pour la protéine NS1

de forme hexamérique, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés, et modifiés pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

De manière avantageuse les modifications des anticorps sont
5 notamment la sélection de fragments Fab ou l'humanisation des anticorps.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de la protéine NS1 de forme hexamérique, pour sélectionner *in vitro* des anticorps spécifiques de ladite protéine NS1 aptes au diagnostic précoce d'une infection par un flavivirus.

10 Dans un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, les anticorps sont des anticorps polyclonaux.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, les anticorps sont des anticorps monoclonaux.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, la
15 protéine est la protéine NS1 du virus de la dengue, notamment de sérotype 1.

Les anticorps monoclonaux anti-NS1 sont avantageusement obtenus par fusion de cellules spléniques de souris immunisée par la protéine NS1 de forme hexamérique avec des cellules myélomateuses appropriées.

La présente invention a également pour objet un procédé
20 d'expression d'un polynucléotide codant pour la protéine NS1 d'un virus de la dengue, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un polynucléotide tel que défini à la séquence SEQ ID N° 1, associé à un promoteur dudit polynucléotide dans des cellules eucaryotes convenables.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent
25 dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

- la figure 1 représente la protéine NS1 extracellulaire hexamérique purifiée obtenue après chromatographie d'exclusion (a) après chromatographie d'exclusion, la protéine est concentrée à 0,5 mg/ml par ultrafiltration et traitée par du diméthylsuberimidate (DMS) à 0, 0,5, 5 et 50 mM. Les produits obtenus sont placés
30 dans un tampon non réducteur de Laemmli, séparés sur un gel d'acrylamide de gradient 4 à 20 % et marqués au bleu de Coomassie. Un échantillon traité par du DMS

50 mM est chauffé pendant 3 min à 95 °C avant électrophorèse pour dissocier les oligomères non covalents. (b) La protéine NS1 purifiée est traitée pendant une nuit à 37 °C par 0,5 % ou 1 % de *n*-octylglucoside (nOG) et éventuellement traitée par 25 mM de DMS pendant 1 heure. Les protéines sont séparées sans dénaturation à chaud sur un gel d'acrylamide de gradient 4 à 20 % et détectée par immunoblotting avec un anticorps monoclonal anti-NS1 de la littérature ou tel que défini précédemment.

- la figure 2 représente la séquence de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1 obtenue par le clone 4C de l'exemple 2 ci-après, ainsi que la séquence codante correspondante.

- la figure 3 illustre les résultats obtenus par dosage de la protéine NS1 circulante par la méthode de détection par ELISA-capture chez des patients infectés préalablement par un virus de la dengue dont les sérums ont été prélevés lors des phases aiguës et convalescentes, ainsi que la comparaison avec les résultats obtenus par les techniques de l'art antérieur IHA (inhibition d'héماغglutination des sérotypes 1, 2, 3 ou 4 du virus de la dengue) et MAC ELISA (*immunoglobulin M Antibody Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ; D1 correspond au sérotype 1 de la dengue ; D2 correspond au sérotype 2 de la dengue ; D3 correspond au sérotype 3 de la dengue et D4 correspond au sérotype 4 de la dengue ; ID = identité du malade ; 1 correspond au premier prélèvement en phase aiguë de la maladie 2 correspond au deuxième prélèvement en phase convalescente (effectuée 2 à 4 semaines après le premier) ; dans le test ELISA-capture, les valeurs sont exprimées en densité optique obtenues pour un même sérum dilué 10, 30 ou 90 fois.

- la figure 4 illustre la détection de la protéine NS1 par le test ELISA-capture sur des sérums de patients infectés par le virus de la dengue de sérotype 1 de Guyane française. Les chiffres indiqués représentent le nombre de patients répartis par catégorie (positivité ou négativité en ELISA-capture et positivité ou négativité en IgM).

- la figure 5 illustre les résultats obtenus pour 4 patients de Guyane française infectés par le virus dengue 1 qui ont été prélevés quotidiennement pendant la phase clinique de la maladie de J1 à J5. Chaque graphe correspond à un patient avec pour

chaque jour de prélèvement, à la fois les résultats de la détection de la protéine NS1 avec le test ELISA-capture développé, les résultats de RT-PCR et les résultats obtenus par la technique MAC-ELISA. Les valeurs de D.O. rapportées ont été corrigées d'une fois la valeur du bruit de fond. Les seuils de positivité sont indiqués par les traits en pointillé.

5 - la figure 6 indique les caractéristiques des anticorps monoclonaux anti NS1 F22 et G18

 - la figure 7 illustre la détection de la protéine NS1 par le test ELISA-capture utilisant l'approche monoclonale par comparaison avec le test ELISA-capture utilisant l'approche polyclonale telle que décrite dans l'exemple 3. Les résultats obtenus
10 sont rapportés sous la forme des valeurs de densité optique mesurées pour chaque dilution de sérum analysé (10ème, 30ème ou 90ème) et retranchées de la valeur moyenne des témoins négatifs.

 - la figure 8 illustre la mise en évidence de la protéine NS1 dans les sérums de patients infectés par le virus de la fièvre jaune, par un test ELISA-capture
15 spécifique de la fièvre jaune. Pour chaque sérum testé est reportée la valeur de densité optique mesurée par le test développé retranchée de la valeur moyenne des témoins négatifs, la valeur de densité optique mesurée par le test MAC-ELISA spécifique des IgM de fièvre jaune et les résultats de l'isolement viral lorsqu'ils sont disponibles.

Exemple 1 : Purification de la protéine NS1 du virus de la dengue, sérotype 1

20 1. Matériel et méthodes

La protéine est produite sur cellules Véro infectées par le virus de la dengue, sérotype 1, souche FGA/89 (P. Després *et al.*, *Virol*, (1993), 196, 209-219), dans les conditions adaptées de la méthode décrite par A.K.I. Falconar *et al.*, (*J. Virol. Meth.*, (1990), 30, 323-332).

25 Le milieu de culture est récolté 5 jours après l'infection et centrifugé à 1500 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de centrifugation est ramené à 20 mM Tris-HCl, 1 mM azide de sodium, concentré 6 fois par ultrafiltration à froid et les particules virales sont éliminées par une précipitation de 2 h à 4 °C, à une concentration de 7,5 % en polyéthylèneglycol (PEG), suivie d'une centrifugation de 30
30 min. à 10 000 g. Le surnageant clarifié, contenant 7,5 % PEG est traité avec 0,05 % Tween 20 et 1 mg/ml d'aprotinine, puis passé sur une colonne d'immunoaffinité sur

laquelle est fixé un anticorps monoclonal anti-NS1. La protéine est éluée selon la technique à la diéthylamine, telle que décrite dans Falconar *et al.*, (précité), concentrée par ultrafiltration et la solution d'élution échangée par un tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5 contenant 1 mM d'azide de sodium.

5 **2. Résultats**

Les résultats sont illustrés dans la figure 1.

La figure 1a montre que la protéine NS1 est bien sous forme hexamérique. La proportion de forme hexamérique augmente avec une concentration croissante en DMS (figure 1a).

10 La protéine de forme hexamérique extracellulaire NS1 peut être transformée en sous-unités dimériques en présence du détergent non ionique, *n*-octylglucoside (nOG) (figure 1b). Après une nuit à 37°C en absence ou en présence de *n*-octylglucoside (nOG) et traitement par du DMS 25 mM, on observe, en l'absence de nOG, la présence de bandes correspondant au dimère, au tétramère et à l'hexamère
15 et en présence de nOG, une dissociation partielle ou complète de l'hexamère en fonction de la concentratin en nOG (figure 1b).

Exemple 2: Expression de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1 par des cellules Vero

1. Matériel et méthodes

20 Le plasmide pCIneo-NS1.FGA déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous le n° I-2220, en date du 7 juin 1999) contenant le gène de la protéine NS1 comprenant le gène codant pour son peptide signal, précédé d'un codon d'initiation de la traduction et suivi d'un codon de terminaison de la traduction est introduit dans la bactérie
25 compétente *Escherichia coli* (Epicurian SURE de Stratagène). Ce plasmide est amplifié en culture bactérienne et purifié selon la technique classique de préparation d'ADN plasmidique. L'ADN purifié est utilisé pour le séquençage de différents clones (la séquence du clone 4C est illustrée à la figure 2) et pour transfecter des cellules Véro à l'aide soit d'un mélange adéquat avec des liposomes cationiques, tel que le
30 DOTAP (Boehringer-Mannheim), ou avec un agent non liposomal, tel que le FuGENE (Boehringer-Mannheim). Le FuGENE et l'ADN sont préincubés dans du milieu sans

sérum pendant 15 min puis le mélange est mis en contact avec un tapis cellulaire de cellules Vero pendant 24 h. Les cellules sont ensuite rincées à l'aide de PBS (*phosphate saline buffer*), fixées 20 min à température ambiante avec une solution de PBS contenant 3% de paraformaldéhyde, perméabilisées 5 min avec du PBS contenant 0,5% Triton X-100. La présence d'antigène NS1 est alors révélée à l'aide d'anticorps spécifiques, reconnus par un anticorps conjugué marqué à la fluorescéine.

2. Résultats

Il est possible de mettre ainsi en évidence par un signal fluorescent élevé, spécifique de l'antigène viral NS1, dans environ 20% des cellules transfectées.

L'expression de NS1 est ainsi démontrée et des lignées stables pourront être établies en présence de néomycine, marqueur de sélection des cellules transfectées.

La figure 2 illustre la séquence de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1 ainsi obtenue ainsi que la séquence codante correspondante.

Exemple 3 : Mise en œuvre de la technique ELISA-capture selon l'invention dans le cadre d'une infection par le virus de la dengue de sérotype 1 et comparaison avec les méthodes de l'état antérieur de la technique

1.Principe de la technique ELISA-capture

L'antigène viral NS1 est capturé par des anticorps polyclonaux de souris monospécifiques préalablement purifiés par immunocapture sur la protéine NS1 hexamérique purifiée de dengue, sérotype 1.

La présence de NS1 est révélée par des anticorps de lapin immunisés par la protéine NS1 hexamérique purifiée, eux-mêmes reconnus par des anticorps conjugués à la peroxydase de raifort.

2. Matériel et méthodes

a- Purification d'anticorps polyclonaux de souris dirigés contre la protéine NS1

a₁– Fixation de la protéine NS1 sur membrane

La protéine NS1 purifiée est fixée par adsorption sur une membrane de nylon amphotérique (Nytran, Schleicher & Schuell). La surface de la membrane est alors saturée par de l'albumine bovine présente à une concentration de 3 % dans une solution saline tamponnée par du phosphate (PBS : *phosphate buffer saline* ; 10 mM

phosphate ; pH7,2 ; 150 mM NaCl). Après 2 rinçages dans du PBS, la membrane est traitée par du PBS contenant 0,25 % de glutaraldéhyde pendant 15 min. à température ambiante. Après 3 rinçages dans du PBS, la membrane est neutralisée par un tampon de 100 mM glycine, 3 % albumine bovine, rincée 2 fois dans du PBS puis conservée à 4°C dans du PBS avec de l'azide de sodium 1 mM.

a₂- Purification des anticorps polyclonaux monospécifiques de souris, (anticorps de capture)

- production des ascites polyclonales : les cerveaux de souris Swiss infectés par le virus de la dengue et moribonds sont broyés dans 9 ml de tampon PBS. Le produit est centrifugé 10 min à 10.000 g à 4° C.

La suspension virale est injectée à des souris Swiss, selon le calendrier suivant :

- J0 : 0,5 ml d'antigène en sous-cutané dans la cuisse,
- J3 : 0,4 ml d'antigène et 0,1 ml d'adjuvant complet de Freund par voie intrapéritonéale,
- J25 : 0,5 ml d'antigène par voie intrapéritonéale,
- J26 : 0,5 ml d'ascite de souris TG180, et
- J28 : 0,5 ml d'antigène par voie intrapéritonéale.

Les ascites sont récoltées à J42.

Après recueil des ascites, on laisse le coagulum se former pendant 1 heure à température ambiante puis on réalise une centrifugation pendant au moins 30 minutes à 1500 g. Le surnageant est laissé une nuit à 4°C. Le pH du surnageant est ajusté à 4,8 avec de l'acide acétique 2 M puis le surnageant est centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. Le pH du surnageant est alors amené à 7,0 – 7,2 par addition d'une solution de soude 2 N. Le surnageant peut être conservé à – 20°C.

- purification des anticorps de souris spécifiques du virus de la dengue de sérotype 1:

La membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans un mélange d'ascites polyclonales dirigées contre les 4 sérotypes du virus de la dengue préparées comme décrit ci-dessus.

Après 3 rinçages de la membrane dans du PBS, les anticorps fixés sur la protéine NS1 sont élués avec une solution de diéthylamine pH 11,4 (milieu Dubelco modifié par Iscove (Gibco) contenant 100 mM diéthylamine). Les anticorps sont concentrés par ultrafiltration et replacés dans un tampon PBS contenant de l'azide de sodium 1 mM.

5 b- Préparation d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine NS1 (anticorps de révélation) :

L'immunisation des lapins a été réalisée par 3 ou 4 injections successives de 30 µg de protéine NS1 hexamérique purifiée selon la méthode de l'exemple 1, réalisées à J0, J7, J21 et éventuellement à J49 et suivies d'une saignée à
10 blanc à J83. Le sérum est appauvri en signal non spécifiques par incubation avec des billes de Sépharose portant un anticorps monoclonal décrit dans la littérature ou préparé comme décrit précédemment.

c- Procédé ELISA-capture

c₁- Courbe étalon

15 Pour chaque plaque ELISA-capture destinée à tester des sérums humains, une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de protéine NS1 purifiée selon la méthode décrite au point 1, dont la concentration initiale est de 0,5 µg/ml et diluée de 3 en 3.

c₂- Détection de la protéine NS1 circulante lors de la phase aiguë :

20 Les anticorps polyclonaux de souris purifiés obtenus selon la méthode décrite précédemment (anticorps de capture) sont fixés sur une plaque, dilués dans une solution de PBS et mis à incuber pendant une nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 5 minutes avec une solution de PBS/Tween 0,05 %, la plaque est saturée avec un mélange de PBS, Tween 0,05 % et de lait 3 %, pendant 30 minutes à température
25 ambiante. Après 3 rinçages avec une solution de PBS / Tween 0,05 %, on dépose les les sérums à tester, dilués ou non, et on laisse réagir pendant une heure, toujours à température ambiante. Les dilutions au 1/10, au 1/30 et au 1/90 sont réalisées dans une solution de PBS / Tween 0,05 %. Après 3 rinçages, on ajoute le second anticorps spécifique de NS1 (anticorps de révélation obtenu au point 3 précédent), après l'avoir
30 dilué dans un mélange de PBS / Tween 0,05 % et de lait 3 %, et on laisse incuber pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 rinçages, l'anticorps anti-IgG dirigé contre le

deuxième anticorps et marqué à la peroxydase, ledit anticorps étant préparé dans des conditions classiques connues de l'homme du métier, est ajouté et l'incubation réalisée pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 rinçages, on révèle pendant 10 minutes par une solution de TMB (3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine, Kierkegaard & Perry Lab).

- 5 La réaction colorimétrique est arrêtée avec de l'acide sulfurique.

3. Résultats

Ils sont illustrés dans la figure 3.

- La technique ELISA-capture selon l'invention permet de détecter la présence de la protéine NS1 dans la phase aiguë de la maladie et ce indépendamment du fait que les malades aient une infection primaire ou secondaire.
- 10

Les résultats confirment que la présence de la protéine NS1 est transitoire, puisque dans les prélèvements réalisés en phase de convalescence, on ne détecte pas cette protéine (figure 3).

- 93 % des prélèvements en phase aiguë de la maladie, se révèlent négatifs par le test MAC ELISA, alors que 100 % des prélèvements réalisés en phase convalescente se révèle positif dans ce même test (figure 3).
- 15

- De la même façon, le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) ne permet pas de détecter l'infection par le virus de la dengue de sérotype 1 dans 80 % des cas en phase aiguë de la maladie mais ce test se révèle positif dans 100 % des prélèvements réalisés en phase convalescente (figure 3). Selon les critères OMS, un taux d'IHA inférieur à 1280 dans le sérum prélevé en phase convalescente permet de diagnostiquer une infection de dengue primaire et un taux supérieur à 1280 une infection de dengue secondaire. La moitié des sérums positifs de cette étude correspondent donc à des cas de dengue primaire et l'autre moitié à des cas de dengue secondaire. La technique ELISA-capture selon l'invention permet ainsi de détecter de la protéine NS1 dans les cas de dengue primaire et secondaire.
- 20
- 25

Exemple 4 : Détermination de la fenêtre de détection

- 30 1. Matériels et méthodes

a- étude réalisée sur une cohorte de patients de Guyane française

infectés par le virus dengue 1

Les prélèvements sont réalisés chez des patients infectés par le virus de la dengue de sérotype 1, entre J0, marquant l'apparition des signes cliniques (initialement une fièvre indifférenciée) et J66 correspondant à la fin de la phase convalescente.

Sur les sérums de ces patients, on recherche la présence de NS1 circulante selon la méthode ELISA-capture décrite dans l'exemple 3 et on compare le résultat obtenu avec la positivité en IgM spécifiques mesurée en MAC-ELISA, lorsque les données sont disponibles.

b- suivi quotidien de 4 patients infectés par le virus dengue 1

Quatre patients ont été prélevés quotidiennement pendant la phase clinique de J1 à J5. Une réaction de RT-PCR pour mettre en évidence l'ARN viral, un test MAC-ELISA pour la détection d'IgM spécifiques du virus de la dengue et une recherche de l'antigène NS1 dengue selon la méthode ELISA-capture décrite précédemment, ont été réalisés sur chaque prélèvement sanguin.

2. Résultatsa- Détermination de la fenêtre de détection

Les résultats sont rassemblés dans la figure 4.

Entre J1 et J6, la possibilité de détecter la protéine NS1 circulante oscille entre 64 % (à J2) et 100 % (à J5) des patients infectés. Au delà de J10, la protéine NS1 circulante n'est plus détectée, alors que la réponse en anticorps devient prédominante.

La détection de la protéine NS1 circulante ne semble pas dépendante de la présence d'IgM totales (spécifiques des antigènes viraux) qui apparaissent dans certains cas à J3 et culminent à partir de J5, ni même, pour certains patients de la présence d'IgG totales qui peuvent apparaître dès J2. En revanche, l'absence de détection de l'antigène NS1 dans des sérums de la phase clinique pourrait s'expliquer par la présence d'IgG spécifiquement dirigées contre NS1.

Ainsi, la fenêtre de détection de l'antigène sérique NS1 par la technique ELISA- capture selon la présente invention se situe de préférence entre J1 et J6 après l'apparition des signes cliniques.

b- suivi quotidien de 4 patients infectés par le virus dengue

Les résultats sont rassemblés dans la figure 5.

Chez les 4 patients étudiés, la protéine NS1 est détectée de manière continue jusqu'à J5, et ce, quelque soit le jour de prélèvement par rapport au début des symptômes.

- 5 Pour certains patients, la fenêtre de détection de la protéine est plus large que la période de virémie, détectée par RT-PCR.

Exemple 5: Mise en oeuvre de la technique ELISA-capture avec des outils monoclonaux dans le cadre d'une infection par le virus de la dengue de sérotype 1 et comparaison avec la technique ELISA-capture précédemment décrite

10 1. Matériel et méthodes

a - Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine NS1 du virus de la dengue sérotype 1

a₁- Production d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine NS1

- 15 L'immunisation des souris Balb/C femelles a été réalisée par 7 injections de 10 µg de protéine NS1 du virus de la dengue sérotype 1, hexamérique, purifiée selon la méthode de l'exemple 1. La première injection en adjuvant complet de Freund et les cinq suivantes en adjuvant incomplet de Freund sont réalisées par voie sous-cutanée à 15 jours d'intervalle. La dernière injection, en adjuvant incomplet
- 20 de Freund, pratiquée trois jours avant le sacrifice de l'animal est effectuée par voie intrapéritonéale.

Les cellules de la rate des souris immunisées sont fusionnées avec le myélome murin et mises en culture jusqu'à l'apparition des clones selon le protocole standard.

25 *a₂- Identification des hybridomes sécrétant des anticorps anti-NS1*

La détection des anticorps spécifiques de la protéine NS1 a été réalisée soit par une technique ELISA classique soit par une technique ELISA-capture

-Technique ELISA classique

- 30 La protéine NS1 hexamérique purifiée selon la méthode de l'exemple 1 est fixée par adsorption sur une plaque à la concentration de 1 µg/ml en

solution de PBS pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages avec une solution de PBS/Tween 0,1% (PT) la protéine est incubée avec les surnageants des différents hybridomes dilués au 1/2 avec une solution de PT contenant 0,5% de gélatine (PTG) pendant 1h à 37°C. Après 3 lavages avec PT, l'anticorps anti-IgG de souris marqué à la peroxydase dilué en PTG est ajouté et incubé pendant 1h à 37°C. Après 3 lavages, on révèle par une solution d'eau oxygénée en présence d'orthophénylènediamine.

-Technique ELISA-capture

La technique utilisée est décrite dans l'exemple 3 (cf Détection de la protéine NS1 circulante dans la phase aigüe) mais en remplaçant les dilutions de sérums à tester par une dilution au 1/10 dans la solution PTG de surnageant de culture de cellules Vero non infectées ou infectées pendant 5 jours par le virus de la dengue sérotype 1 et précipité avec 7% de polyéthylèneglycol (cf exemple 1: purification de la protéine NS1 du virus de la dengue sérotype 1). La réactivité des surnageants des différents hybridomes vis à vis du surnageant de culture de cellules Vero non infectées sert de témoin de signal non spécifique.

a3- Réactivité des anticorps monoclonaux anti-NS1 par immunofluorescence indirecte sur des cellules Vero infectées par l'un des 4 sérotypes du virus de la dengue

Les cellules Vero sont infectées 40h avec l'un des 4 sérotypes du virus de la dengue:

sérotype 1: souche FGA/89

sérotype 2: souche NG

sérotype 3: souche H87

sérotype 4: souche H241

Après 1 lavage avec une solution de PBS, les cellules sont fixées par une solution de paraformaldéhyde à 3% en PBS pendant 30 minutes à la température du laboratoire. Les cellules rincées en PBS sont ensuite perméabilisées par une solution de Triton X-100 à 0,5% en PBS pendant 10 minutes. Après rinçage en PBS, les cellules sont incubées pendant 1h avec les surnageants des différents hybridomes ayant réagi positivement en ELISA. Après 3 lavages avec du PBS, l'anticorps anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine est ajouté et incubé pendant 1h. Après 3 lavages en

PBS, les lames sont recouvertes d'une lamelle et observées sous microscope à fluorescence.

a₄- Préparation des ascites monoclonales de souris

Les ascites monoclonales sont produites chez des souris Balb/C. Les
5 souris reçoivent une injection intrapéritonéale de 0,5ml de pristane (2,6,10,14-tetraméthyl-pentadecane Sigma) une semaine avant l'injection intrapéritonéale du clone d'hybridome sécrétant l'anticorps monoclonal. Les ascites sont prélevées au fur et à mesure de leur formation, centrifugées à 1500 rpm pendant 20 minutes et conservées à -20°C.

10 ***a₅- Détermination de l'isotype des anticorps monoclonaux anti-NS1***

La détermination de l'isotype de l'anticorps anti-NS1 s'effectue par ELISA à l'aide d'anticorps dirigés contre les différentes sous-classes d'immunoglobulines murines: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. La détermination de la chaîne légère de l'immunoglobuline est réalisée suivant une méthodologie identique.

15 ***a₆- Détermination de la constante d'affinité des anticorps monoclonaux anti-NS1*** (B Friguet et al., *J.Immunol*, (1985), 77, 305-319)

L'affinité d'un anticorps correspond à la concentration en antigène nécessaire pour saturer 50% des sites de l'anticorps. Une incubation est réalisée en milieu liquide entre l'anticorps à concentration constante et l'antigène à concentration
20 décroissante pendant 1 nuit à 4°C afin d'atteindre l'équilibre de la réaction. La concentration en anticorps libre, après équilibre, est déterminée par un test ELISA: le mélange est déposé sur une plaque préalablement incubée avec l'antigène. Après une incubation de 20 minutes à 4°C (pour éviter un déplacement de l'équilibre), la révélation de l'ELISA se fait avec un anti-IgG de souris couplé à la B galactosidase
25 suivi de la réaction enzymatique. La constante de dissociation KD est ensuite déterminée.

30 ***a₇- Réaction de compétition des différents anticorps monoclonaux anti-NS1***

Cette réaction permet de déterminer la spécificité des anticorps

monoclonaux vis à vis d'un même épitope ou d'épitopes différents. La détermination épitopique met en jeu la réactivité pour un antigène, d'un anticorps monoclonal non marqué et d'un deuxième anticorps monoclonal couplé à la biotine.

Le premier anticorps monoclonal non marqué est placé à concentration saturante (préalablement déterminée par ELISA) sur une plaque sur laquelle a été préalablement fixé l'antigène et incubé 2h à 37°C. Après 4 lavages en solution PT à 4°C, le deuxième anticorps monoclonal couplé à la biotine est ajouté et incubé 20 minutes à 4°C. Après 4 lavages en solution PT à 4°C, la solution de conjugué streptavidine marquée à la peroxydase est ajoutée et incubée 1h à 37°C. Après 4 lavages en solution PT, on révèle par une solution d'eau oxygénée en présence d'orthophénylènediamine. L'obtention d'un signal après lecture au spectrophotomètre indique que les épitopes reconnus par les 2 anticorps sont différents. Dans le cas inverse, les 2 anticorps monoclonaux sont dirigés contre le même épitope de l'antigène.

15 b- purification des anticorps monoclonaux G18 et F22

Les anticorps G18 et F22 sont purifiés par immunoaffinité comme décrit dans l'exemple 3 .

c- détection de la protéine NS1 circulante par un test ELISA-capture utilisant les anticorps monoclonaux

20 Les anticorps monoclonaux purifiés G18 et F22 sont mélangés dans une solution de PBS à une dilution donnée et mis à incuber une nuit à 4°C. Les étapes suivantes de ce test ELISA sont semblables à celles de l'exemple précédent.

d- comparaison du test ELISA-capture utilisant l'approche monoclonale avec celui utilisant l'approche polyclonale

25 Un panel de sérum de Guyane française a été testé le même jour avec le test ELISA-capture utilisant l'approche monoclonale et celui utilisant l'approche polyclonale. Les sérums sont testés à différents dilutions: 10ème, 30ème et 90ème.

2. Résultats

a- Caractéristiques des anticorps monoclonaux

30 Les résultats sont regroupés dans la figure 6.

Les anticorps G18 et F22 ont été sélectionné pour leur capacité à se

fixer, avec une forte affinité, sur des épitopes différents de la protéine NS1. L'anticorps F22 est spécifique du sérotype 1, G18 des sérotypes 1 et 3 du virus de la dengue.

b- Utilisation des anticorps monoclonaux pour la capture d'antigène

5 **NS1.**

Les résultats sont regroupés dans la figure 7.

Les anticorps monoclonaux sélectionnés non seulement reproduisent les résultats obtenus avec l'approche polyclonale mais ils présentent des réactivités plus marquées que les anticorps polyclonaux. L'outil monoclonal développé semble
10 donc particulièrement adapté à l'utilisation diagnostique qui doit en être faite.

Exemple 6: Mise en oeuvre de la technique ELISA-capture selon l'invention dans le cadre d'une infection par un autre sérotype du virus de la dengue ou un autre flavivirus

1. Matériel et méthodes

15

a- Préparation des surnageants de culture

Les cellules Véro sont infectées soit par le virus dengue 2, soit par le virus de l'encéphalite japonaise ou le virus de la fièvre jaune. Les surnageants de culture sont ensuite préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 1

b-Purification des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine

20 **NS1 du virus de la fièvre jaune et de l'encéphalite japonaise**

Les ascites monoclonales des anticorps 8G4, 1A5, et 2D10 (J.J. Schlesinger *et al.*, *Virology*, (1983), 125, 8-17) dirigés contre la protéine NS1 du virus de la fièvre jaune et des anticorps 171-2-2 et 70-14-20 dirigés contre la protéine NS1 du virus de l'encéphalite japonaise sont purifiées sur des billes de protéine A
25 Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech). Ces ascites monoclonales sont mises à incuber une nuit à 4°C sur les billes de protéine A. Après 3 rinçages des billes en PBS/Tween 0,05%, les anticorps fixés sur les billes de protéine A sont élués avec une solution de tampon glycine pH=3. Ils sont ensuite concentrés par ultrafiltration et replacés dans un tampon PBS contenant de l'azide de sodium 1mM.

30

c- Détection de la protéine NS1 dans les surnageants de culture du virus dengue 2

c₁- Anticorps utilisés

L'étape de capture est réalisée avec un mélange des ascites des anticorps monoclonaux 3D1.4 et 1A12 (A.K.I. Falconar *et al.*, *Arch. Virology*, (1994), 137, 315-326). La reconnaissance de la protéine se fait ensuite avec un mélange de
5 deux anticorps de lapin: le sérum obtenu après immunisation avec la protéine purifiée décrit dans l'exemple 3 et un sérum de lapin obtenu après immunisation avec les virus des quatre sérotypes de dengue.

c₂- Procéde ELISA-capture

La technique utilisée est la même que celle décrite dans l'exemple 3

10 d- Détection de la protéine NS1 dans les surnageants de culture du virus de l'encéphalite japonaise

d₁- Anticorps utilisés

Les anticorps monoclonaux 171-2-2 et 70-14-20 purifiés sont utilisés pour l'étape de capture. La reconnaissance de la protéine se fait ensuite avec un
15 mélange de deux sérums de lapins qui ont été immunisés préalablement avec des protéines recombinées de la protéine NS1 de l'encéphalite japonaise.

d₂- Procéde ELISA-capture

La technique utilisée est la même que celle décrite dans l'exemple 3

20 e-Détection de la protéine NS1 dans les surnageants de culture du virus de la fièvre jaune et les sérums de patients infectés par ce virus

e₁- Anticorps utilisés

Les anticorps monoclonaux 8G4, 1A5, et 2D10 purifiés sont mélangés à une dilution donnée dans une solution de PBS et utilisés comme anticorps de capture. Le second anticorps spécifique de NS1 fièvre jaune utilisé provient d'un
25 sérum de lapin immunisé préalablement contre la protéine NS1 du virus 17D de la fièvre jaune (J.J. Shlesinger *et al.*, *J. immunol.* (1985), 135, 2805-2809).

e₂- Procéde ELISA-capture

La technique utilisée est la même que celle décrite dans l'exemple 3

30

2. Résultats

La sécrétion de la protéine NS1 a précédemment été rapportée dans

des cultures cellulaires *in vitro* infectées par différents flavivirus, le virus de la DEN2 (Winkler *et al.*, *Virology* (1988), 162, 187-196, Pryor *et al.*, *Virology* (1993), 194, 769-780), de l'encéphalite à tique (Lee *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1989), 70, 335-343, Crooks *et al.*, *J. Chrom.* (1990), 502, 59-68, Crooks *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1994), 75, 3453-3460), de l'encéphalite japonaise (Mason, *Virology* (1989), 169, 354-364, Fan *et al.*, *Virology* (1990), 177, 470-476), de l'encéphalite de la vallée de Murray (Hall *et al.*, *J. Virol. Meth.* (1991), 32, 11-20) et de la fièvre jaune (Post *et al.*, *Vir. Res.* (1990), 18, 291-302). Comme ces résultats ont été obtenus par des techniques différentes de l'ELISA, nous avons recherché à mettre en évidence la protéine, par la technique
10 ELISA-capture de la présente invention, dans des surnageants de cellules de mammifère infectées.

La protéine NS1 est détectable dans les surnageants de culture des cellules Vero infectées soit par le virus DEN2, soit par le virus de l'encéphalite japonaise, soit par le virus de la fièvre jaune.

15 La protéine a aussi pu être mise en évidence par cette technique dans des sérums de patients infectés par le virus de la fièvre jaune comme le démontre les résultats rassemblés dans la figure 8. Parmi les 18 sérums généreusement fournis par Ch. Mathiot (Institut Pasteur de Dakar), 7 sont positifs en antigénémie NS1 et comme pour le virus DEN1, la détection de la protéine NS1 circulante semble indifférente à la
20 présence d'IgM spécifiques de la fièvre jaune.

La technique ELISA-capture selon la présente invention permet de détecter de la protéine NS1 dans les surnageants de culture de cellules infectées par différents flavivirus et dans les sérums des patients infectés par le virus de la fièvre jaune. Elle pourrait avoir de ce fait une application diagnostique pour déceler une
25 infection par d'autre flavivirus que le virus DEN1.

REVENDECATIONS

1°) Méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, caractérisée en ce qu'elle comprend la détection de la glycoprotéine non-structurale NS1 d'un flavivirus dans un échantillon biologique, pendant toute la durée de la phase
5 clinique de l'infection, par une méthode immunologique mettant en œuvre au moins deux anticorps identiques ou différents,

- le premier anticorps ou anticorps de capture de la glycoprotéine NS1 étant constitué par des anticorps choisis dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux préalablement sélectionnés par
10 immunocapture sur la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, et

- des mélanges d'anticorps monoclonaux anti-NS1 préalablement sélectionnés pour leur affinité élevée pour la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés,

- le deuxième anticorps ou anticorps de révélation étant choisi dans le groupe constitué
15 par :

- des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine NS1 de forme hexamérique et

- un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine NS1 de forme hexamérique.

20 2°) Méthode de détection selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'infection flavivirale est une infection par le virus de la dengue.

3°) Méthode de détection selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le premier anticorps est fixé sur un support solide convenable et le deuxième anticorps est éventuellement conjugué à un marqueur
25 approprié.

4°) Méthode de détection selon la revendication 3, caractérisée en ce que lorsque le deuxième anticorps n'est pas conjugué à un marqueur, sa liaison à la protéine NS1 fixée sur le support solide, est alors détectée par un troisième anticorps conjugué à un marqueur convenable.

30 5°) Méthode de détection selon la revendication 4, caractérisée en ce que le troisième anticorps est conjugué à une enzyme.

6°) Méthode de détection selon la revendication 5, caractérisée en ce que :

- le premier anticorps ou anticorps de capture est constitué par des anticorps polyclonaux de souris, sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1 du virus de la dengue, ladite protéine étant sous forme hexamérique, et
- le deuxième anticorps ou anticorps de détection de la présence de NS1 dans l'échantillon biologique à analyser, est constitué par des anticorps polyclonaux de lapin immunisé par de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1, ladite protéine étant sous forme hexamérique, la fixation dudit deuxième anticorps étant révélée par un troisième anticorps constitué par des anticorps, conjugués à la peroxydase et dirigés contre le deuxième anticorps.

7°) Coffret de diagnostic précoce d'une infection flavivirale, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un anticorps de capture et au moins un anticorps de révélation tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6,
- au moins un contrôle positif constitué par la protéine NS1 d'un flavivirus et/ou de différents sérotypes selon le flavivirus, ladite protéine, étant sous forme hexamérique, et
- au moins un contrôle négatif constitué par un sérum humain normal.

8°) Coffret de diagnostic selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite protéine NS1 est obtenue à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 d'un flavivirus ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer tout ou partie de la protéine NS1.

9°) Coffret de diagnostic précoce d'une infection flavivirale selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la protéine NS1 est celle du virus de la dengue.

10°) Coffret de diagnostic précoce d'une infection flavivirale selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit plasmide a été

déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2220, en date du 7 juin 1999.

11°) Procédé de purification de la protéine NS1 d'un flavivirus, sous forme hexamérique, à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de
5 mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer la protéine NS1, caractérisé en ce que, préalablement à la purification de la protéine NS1 par les techniques classiques, il comprend une étape de séparation de la forme soluble de la
10 protéine NS1 de la forme microparticulaire de ladite protéine, par traitement par un agent précipitant puis par centrifugation.

12°) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif la protéine NS1 d'un flavivirus, de forme hexamérique, éventuellement associée à d'autres protéines, en association avec au moins un véhicule
15 pharmaceutiquement acceptable.

13°) Composition immunogène selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un mélange des protéines NS1 de forme hexamérique correspondant aux différents sérotypes du virus de la dengue.

14°) Utilisation de la protéine NS1, de forme hexamérique ou d'un
20 de ses systèmes d'expression, pour la préparation d'une composition immunogénique, apte à induire la production d'anticorps *in vivo*.

15°) Utilisation d'au moins un anticorps monoclonal anti-NS1 présentant une affinité élevée pour la protéine NS1 de forme hexamérique, ladite forme étant non dégradée, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés, et
25 modifiés pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

16°) Utilisation de la protéine NS1 de forme hexamérique, ladite forme étant non dégradée, pour sélectionner *in vitro* des anticorps spécifiques anti-NS1 aptes au diagnostic précoce d'une infection par un flavivirus.

30 17°) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif sélectionné dans le groupe constitué par :

- un polynucléotide capable d'exprimer tout ou partie de la protéine NS1 du virus de la dengue quel que soit son sérotype et

- un système d'expression comprenant au moins un promoteur capable de faire exprimer chez l'hôte où elle est injectée, l'ADN codant pour la protéine NS1 du virus de la dengue quel que soit son sérotype, ledit gène exprimant ladite protéine,

en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

18°) Procédé d'expression d'un polynucléotide codant pour la protéine NS1 d'un virus de la dengue, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un polynucléotide tel que défini à la séquence SEQ ID N° 1, associé à un promoteur dudit polynucléotide dans des cellules eucaryotes convenables.

19°) Procédé de purification de la protéine NS1 selon la revendication 11, caractérisé en ce que le flavivirus est un virus de la dengue quel que soit son sérotype.

20°) Procédé de purification de la protéine NS1 selon les revendications 11 et 19, caractérisé en ce que le flavivirus est un virus de la dengue de sérotype 1

1/8

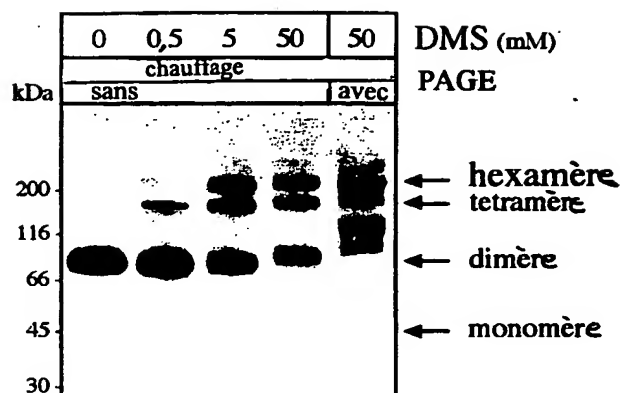


FIG. 1a

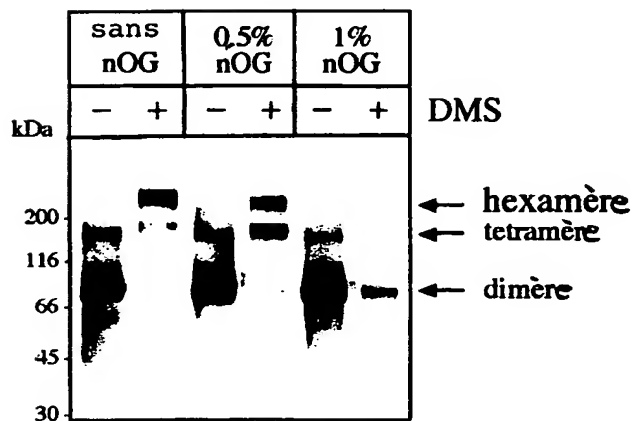


FIG. 1b

2/8

SEQ ID N° 1 : Protéine NS1 du virus de la dengue, sérotype 1

```

1/1                               31/11
atg agg agc gcg tcg ctt tcg atg acg tgc att gca gtt ggc atg gtt aca ctg tac cta
Met arg ser ala ser leu ser met thr cys ile ala val gly met val thr leu tyr leu
61/21                               91/31
gga gtc atg gtt caa gcg gac tcg gga tgt gca atc aac tgg aag ggc aga gaa ctc aaa
gly val met val gln ala asp ser gly cys val ile asn trp lys gly arg glu leu lys
121/41                               151/51
tgt gga agt ggc att ttt gtc act aat gaa gtc cac act tgg aca gag caa tac aaa ttc
cys gly ser gly ile phe val thr asn glu val his thr trp thr glu gln tyr lys phe
181/61                               211/71
cag gct gac tcc cca aaa aga ctg tca gca gcc att ggg aag gca tgg gag gag ggc gtg
gln ala asp ser pro lys arg leu ser ala ala ile gly lys ala trp glu glu gly val
241/81                               271/91
tgt gga att cga tca gcc acg cgt ctt gag aac atc atg tgg aag caa ata tca aat gaa
cys gly ile arg ser ala thr arg leu glu asn ile met trp lys gln ile ser asn glu
301/101                               331/111
ctg aac cac att cta ctt gaa aat gac atg aaa ttc aca gtg gtt gta gga gat gct aat
leu asn his ile leu leu glu asn asp met lys phe thr val val val gly asp ala asn
361/121                               391/131
gga att ttg gcc cag ggg aaa aaa atg atc agg cca caa ccc atg gaa cac aaa tac tca
gly ile leu ala gln gly lys lys met ile arg pro gln pro met glu his lys tyr ser
421/141                               451/151
tgg aaa agc tgg gga aaa gcc aag atc ata gga gca gac aca cag aat acc acc ttc atc
trp lys ser trp gly lys ala lys ile ile gly ala asp thr gln asn thr thr phe ile
481/161                               511/171
atc gac ggc cca gac act cca gaa tgc ccc gat gac caa aga gcg tgg aac att tgg gaa
ile asp gly pro asp thr pro glu cys pro asp asp gln arg ala trp asn ile trp glu
541/181                               571/191
gtt gag gac tat ggg ttt gga att ttc acg aca aac ata tgg ctg aaa ttg cgt gac tcc
val glu asp tyr gly phe gly ile phe thr thr asn ile trp leu lys leu arg asp ser
601/201                               631/211
tac acc caa atg tgt gac cac cgg cta atg tca gct gcc gtc aag gac agc aag gca gtc
tyr thr gln met cys asp his arg leu met ser ala ala val lys asp ser lys ala val
661/221                               691/231
cat gct gac atg ggg tac tgg ata gaa agt gaa aag aac gag acc tgg aag cta gcg aga
his ala asp met gly tyr trp ile glu ser glu lys asn glu thr trp lys leu ala arg
721/241                               751/251
gcc tcc ttc ata gaa gtc aag aca tgc att tgg ccg aaa tcc cac act cta tgg agt aat
ala ser phe ile glu val lys thr cys ile trp pro lys ser his thr leu trp ser asn
781/261                               811/271
gga gtt ttg gaa agt gaa atg ata atc cca aag ata tat gga gga cca ata tct cag cac
gly val leu glu ser glu met ile ile pro lys ile tyr gly gly pro ile ser gln his
841/281                               871/291
aat tac aga cca ggg tat ttc aca caa aca gca ggg cca tgg cac cta ggt aag ttg gaa
asn tyr arg pro gly tyr phe thr gln thr ala gly pro trp his leu gly lys leu glu
901/301                               931/311
ttg gat ttt gac ttg tgt gaa ggc acc aca gtt gtt gtg gat gaa cat tgt gga aat cga
leu asp phe asp leu cys glu gly thr thr val val val asp glu his cys gly asn arg
961/321                               991/331
ggt cca tct ctc aga act aca aca gtc aca gga aag ata atc cat gaa tgg tgt tgc aga
gly pro ser leu arg thr thr thr val thr gly lys ile ile his glu trp cys cys arg
1021/341                               1051/351
tcc tgc acg tta ccc ccc tta cgc ttc aga gga gaa gac gga tgt tgg tat ggc atg gaa
ser cys thr leu pro pro leu arg phe arg gly glu asp gly cys trp tyr gly met glu
1081/361                               1111/371
atc aga cca gtt aag gag aag gag gag aac cta gtt agg tca atg gtc tct gca taa
ile arg pro val lys glu lys glu glu asn leu val arg ser met val ser ala

```

FIG. 2

LD.	IHA				MAC	D.O. lors du dosage NSI		
	D1	D2	D3	D4	ELISA	10ème	30ème	90ème
NOL 1	0	0	0	NR	NEG	0,24	0,16	0,13
NOL 2	10	40	10	NR	POS	0,13	0,10	0,09
NOT 1	0	0	0	NR	NEG	0,53	0,26	0,14
NOT 2	40	160	160	NR	POS	0,01	0,01	0,01
MONT 1	0	0	0	NR	NEG	1,02	0,67	0,44
MONT 2	320	40	20	NR	POS	0,03	0,02	0,02
BAIL 1	0	0	0	NR	NEG	1,20	0,83	0,64
BAIL 2	80	160	160	NR	POS	0,06	0,07	0,08
LEG 1	0	0	0	0	NEG	1,50	1,09	0,56
LEG 2	160	80	160	NR	POS	0,05	0,05	0,06
SGH 1	0	0	0	NR	NEG	0,76	0,54	0,26
SGH 2	80	640	160	NR	POS	0,03	0,02	0,03
DETT 1	0	0	0	NR	NEG	0,23	0,13	0,09
DETT 2	640	160	160	NR	POS	0,05	0,05	0,04
CON 1	0	0	0	0	NEG	0,23	0,10	0,10
CON 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,12	0,07	0,03
BOLL 1	0	0	0	0	NEG	0,42	0,48	0,23
BOLL 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,09	0,08	0,20
PORN 1	0	0	0	NR	NEG	0,54	0,54	0,44
PORN 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,02	0,02	0,01
PAJ 1	0	0	0	0	NEG	1,71	1,27	0,73
PAJ 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,07	0,07	0,06
PLAQ 1	10	20	20	NR	NEG	1,32	0,86	0,43
PLAQ 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,28	0,18	0,18
GOH 1	10	40	20	NR	NEG	1,35	1,15	0,26
GOH 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,06	0,09	0,14
BEAU 1	10	20	20	40	POS	1,01	0,76	0,53
BEAU 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,07	0,08	0,07

Figure 3

4/8

	ELISA NS1 +		ELISA NS1 -		% DE POSITIVITE
	MAC IgM -	MAC IgM+	MAC IgM -	MAC IgM+	EN NS1
J ₀	2				-
J ₁	13		3		81,2
J ₂	8	1	6		64,3
J ₃	10	4	1		93
J ₄	4	6			100
J ₅	1	6			100
J ₆		4		1	80
J ₇		1		1	-
J ₈				1	-
J ₉		1		2	-
J ₁₁ à J ₆₆				33	0

Figure 4

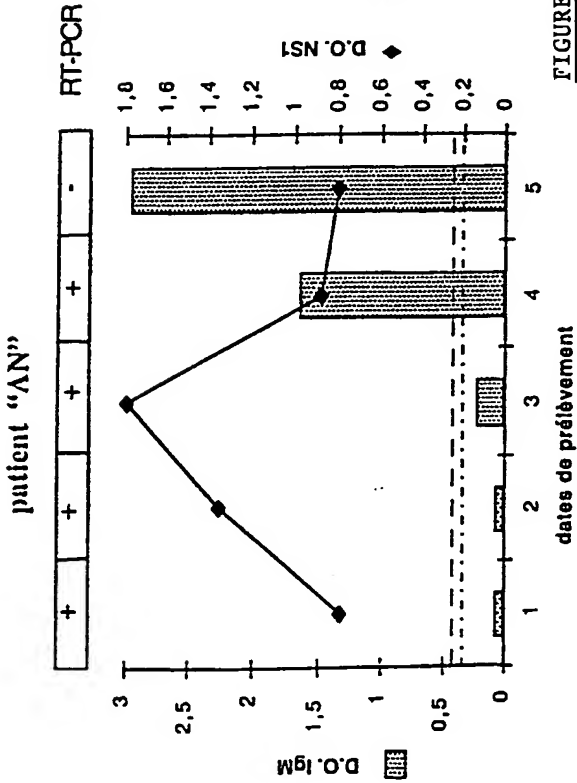
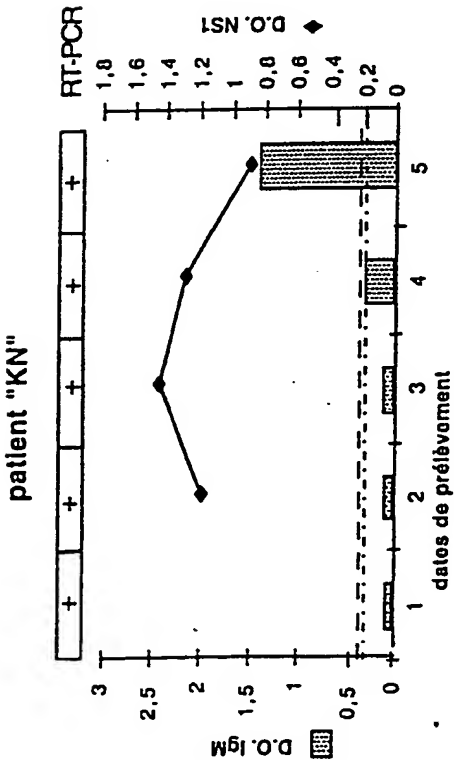
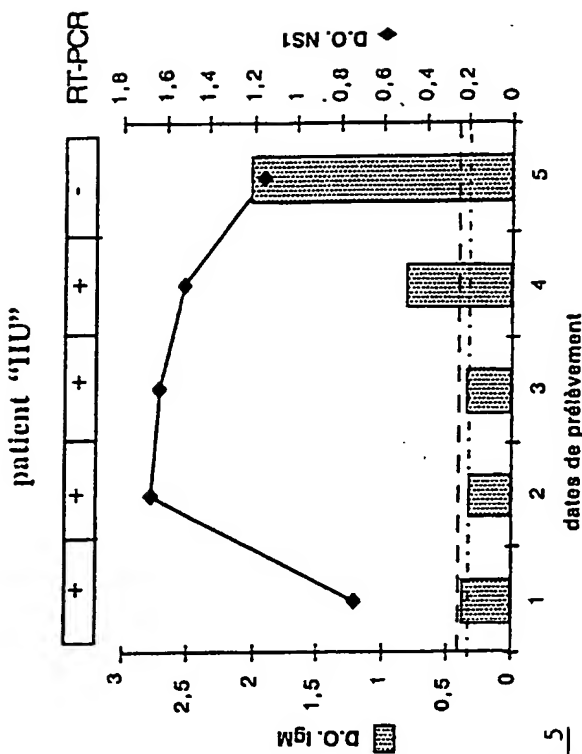
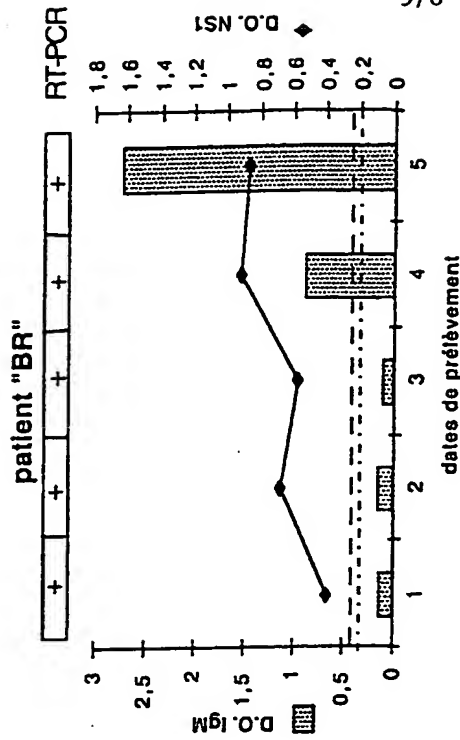


FIGURE 5

	F22	G18
REACTIVITE EN ELISA (NS1 DEN1)		
NS1 hexamérique soluble purifiée	+	+
NS1 hexamérique soluble immunocaptée	+	+
REACTIVITE EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE		
cellules infectées DEN1	+	+
cellules infectées DEN2	-	-
cellules infectées DEN3	-	+
cellules infectées DEN4	-	-
ISOTYPE	IgG1 K	IgG1 K
CONSTANTE D’AFFINITE	$2.7.10^{-9}$ M	3.10^{-11} M
EPITOPE	A	B

Figure 6

n° du patient	J	IgM	D.O. avec monoclonaux			D.O. avec polyclonaux		
			10ème	30ème	90ème	10ème	30ème	90ème
314	1	-	0,33	0,22	0,10	0,11	0,07	0
231	3	-	0,80	0,68	0,33	0,41	0,22	0,05
292	3	-	0,84	0,74	0,43	0,47	0,33	0,16
304	3	+	1,23	0,92	0,59	0,66	0,41	0,22
371	3	+	1,10	1,10	0,81	0,68	0,49	0
88	4	-	1,24	1,27	1,19	1,13	0,95	0,35
106	5	+	1,28	1,25	1,26	0,95	0,86	0,16
383	13	+	0,04	0,04	0,04	0,09	0,07	0,01
222	29	+	0,01	0,01	0,02	0,07	0,06	0
267	50	+	0,01	0,01	0	0,06	0,05	0,03

FIGURE 7

8/8

N° sérum	DO MAC IgM FJ	DO NS1 FJ	isolement viral
1	0,306	1,13	+
2	0,535	1,20	+
3	0,364	0,6	
4	0,578	0,65	
5	0,741	0,75	
6	0,968		
7	1,013		
8	1,101		
9	1,159		
10	1,278	0,61	
111	1,336		
12	1,448		
13	1,466		
14	1,501		
15	1,523	1,19	
16	1,587		
17	1,940		
18	2,109		

Figure 8

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR
 FLAMAND Marie
 MEGRET Françoise
 ALCON Sophie
 TALARMIN Antoine
 DESPRES Philippe
 DEUBEL Vincent

<120> METHODE DE DETECTION PRECOCE DES FLAVIVIRUS ET SES
 APPLICATIONS

<130> S228FR78B

<140>

<141>

<150> FR9907290

<151> 1999-06-09

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1137

<212> ADN

<213> Dengue virus type 1 NS1 protein

<400> 1

```

atgaggagcg cgtcgctttc gatgacgtgc attgcagttg gcatggttac actgtaccta 60
ggagtcatgg ttcaagcgga ctcgggatgt gtaatcaact ggaagggcag agaactcaaa 120
tgtggaagtg gcatttttgt cactaatgaa gtccacactt ggacagagca atacaaattc 180
caggctgact ccccaaaaag actgtcagca gccattggga aggcattggga ggagggcggtg 240
tgtggaattc gatcagccac gcgtcttgag aacatcatgt ggaagcaaat atcaaatgaa 300
ttgaaccaca ttctacttga aaatgacatg aaattcacag tggttgtagg agatgctaata 360
ggaatttttg cccaggggaa aaaaatgac aggccacaac ccatggaaca caaataactca 420
tggaaaagct ggggaaaagc caagatcata ggagcagaca cacagaatac caccttcatac 480
atcgacggcc cagacactcc agaatgcccc gatgaccaa gagcgtggaa catttgggaa 540
gttgaggact atgggttttg aattttcacg acaaacatat ggctgaaatt gcgtgactcc 600
tacacccaaa tgtgtgacca ccggctaata tcagctgccg tcaaggacag caaggcagtc 660
catgctgaca tgggttactg gatagaaagt gaaaagaacg agacctggaa gctagcgaga 720
gcctccttca tagaagtcaa gacatgcatt tggccgaaat cccacactct atggagtaat 780
ggagttttgg aaagtgaat gataatccca aagatatatg gaggaccaat atctcagcac 840
aattacagac caggttattt cacacaaaca gcagggccat ggcacctagg taagttggaa 900
ttggattttg acttgtgtga aggcaccaca gttgttgtgg atgaacattg tggaaatcga 960
ggtccatctc tcagaactac aacagtcaca ggaaagataa tccatgaatg gtgttgacga 1020
tcctgcacgt tacccttcct acgcttcaga ggagaagacg gatgttggtg tggcatggaa 1080
atcagaccag ttaaggagaa ggaggagaac ctagttaggt caatggtctc tgcataa 1137

```

<210> 2

<211> 378

<212> PRT

<213> Dengue virus type 1 NS1 protein

<400> 2

```

Met Arg Ser Ala Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile Ala Val Gly Met Val
  1              5              10              15

```

Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala Asp Ser Gly Cys Val Ile
 20 25 30
 Asn Trp Lys Gly Arg Glu Leu Lys Cys Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr
 35 40 45
 Asn Glu Val His Thr Trp Thr Glu Gln Tyr Lys Phe Gln Ala Asp Ser
 50 55 60
 Pro Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Gly Lys Ala Trp Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Cys Gly Ile Arg Ser Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Met Trp Lys Gln
 85 90 95
 Ile Ser Asn Glu Leu Asn His Ile Leu Leu Glu Asn Asp Met Lys Phe
 100 105 110
 Thr Val Val Val Gly Asp Ala Asn Gly Ile Leu Ala Gln Gly Lys Lys
 115 120 125
 Met Ile Arg Pro Gln Pro Met Glu His Lys Tyr Ser Trp Lys Ser Trp
 130 135 140
 Gly Lys Ala Lys Ile Ile Gly Ala Asp Thr Gln Asn Thr Thr Phe Ile
 145 150 155 160
 Ile Asp Gly Pro Asp Thr Pro Glu Cys Pro Asp Asp Gln Arg Ala Trp
 165 170 175
 Asn Ile Trp Glu Val Glu Asp Tyr Gly Phe Gly Ile Phe Thr Thr Asn
 180 185 190
 Ile Trp Leu Lys Leu Arg Asp Ser Tyr Thr Gln Met Cys Asp His Arg
 195 200 205
 Leu Met Ser Ala Ala Val Lys Asp Ser Lys Ala Val His Ala Asp Met
 210 215 220
 Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Glu Thr Trp Lys Leu Ala Arg
 225 230 235 240
 Ala Ser Phe Ile Glu Val Lys Thr Cys Ile Trp Pro Lys Ser His Thr
 245 250 255
 Leu Trp Ser Asn Gly Val Leu Glu Ser Glu Met Ile Ile Pro Lys Ile
 260 265 270
 Tyr Gly Gly Pro Ile Ser Gln His Asn Tyr Arg Pro Gly Tyr Phe Thr
 275 280 285
 Gln Thr Ala Gly Pro Trp His Leu Gly Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp
 290 295 300
 Leu Cys Glu Gly Thr Thr Val Val Val Asp Glu His Cys Gly Asn Arg
 305 310 315 320
 Gly Pro Ser Leu Arg Thr Thr Thr Val Thr Gly Lys Ile Ile His Glu
 325 330 335

Trp Cys Cys Arg Ser Cys Thr Leu Pro Pro Leu Arg Phe Arg Gly Glu
340 345 350

Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Val Lys Glu Lys Glu
355 360 365

Glu Asn Leu Val Arg Ser Met Val Ser Ala
370 375

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/569 C07K14/18 A61K39/12 A61K48/00 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CROOKS AJ, LEE JM, EASTERBROOK LM, TIMOFEEV AV, STEPHENSON JR: "The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 75, no. 12, December 1994 (1994-12), pages 3453-3460, XP002132937 cited in the application page 3459, column 1, paragraph 3 -/-	11-16, 19,20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November 2000

Date of mailing of the international search report

24/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01620

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A FALCONAR ET AL: "Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein" ARCHIVES OF VIROLOGY, US, NEW YORK, NY, vol. 137, no. 3/04, 1994, pages 315-326-326, XP002101238 ISSN: 0304-8608 cited in the application the whole document	12-16
X	FALCONAR AK, YOUNG PR: "Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 72, no. 4, April 1991 (1991-04), pages 961-965, XP000890192 the whole document	16
A	WO 93 22440 A (TAN BOON HUAN ;YAP EU HIAN (SG); CHAN YOW CHEONG (SG); FU JIANLIN) 11 November 1993 (1993-11-11) page 5, line 14 -page 6, line 2 examples 6-9 claims 9-11,16,17	1-10,16
A	EP 0 402 116 A (IMMUNO AG) 12 December 1990 (1990-12-12) claims 1-6	11-20
A	FALCONAR AK, YOUNG PR: "Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 30, no. 3, December 1990 (1990-12), pages 323-332, XP000879370 cited in the application the whole document	11-16, 19,20
A	JACOBS SC, STEPHENSON JR, WILKINSON GW: "High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 4, April 1992 (1992-04), pages 2086-2095, XP000884360 cited in the application the whole document	11-16, 18-20
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01620

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FLAMAND M, CHEVALIER M, HENCHAL E, GIRARD M, DEUBEL V: "Purification and renaturation of Japanese encephalitis virus nonstructural glycoprotein NS1 overproduced by insect cells" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 6, no. 4, August 1995 (1995-08), pages 519-527, XP000879369 the whole document</p>	<p>11,16, 19,20</p>
A	<p>HALL R A ET AL: "Immunoaffinity purification of the NS1 protein of Murray Valley encephalitis virus: selection of the appropriate ligand and optimal conditions for elution." JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, (1991 APR) 32 (1) 11-20., XP000890099 the whole document</p>	<p>11,16</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9322440 A	11-11-1993	AT 161048 T	15-12-1997
		AU 679179 B	26-06-1997
		AU 4257593 A	29-11-1993
		CA 2134666 A	11-11-1993
		DE 69315689 D	22-01-1998
		DE 69315689 T	02-04-1998
		EP 0638122 A	15-02-1995
		SG 47384 A	17-04-1998
		US 6017535 A	25-01-2000
EP 0402116 A	12-12-1990	AT 143373 T	15-10-1996
		CA 2018332 A	06-12-1990
		CS 9002806 A	12-11-1991
		DD 297997 A	30-01-1992
		DE 69028658 D	31-10-1996
		DE 69028658 T	06-03-1997
		HU 54306 A	28-02-1991
		JP 3151878 A	28-06-1991
		NO 902491 A	07-12-1990
		SK 277781 B	05-01-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01620

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N33/569 C07K14/18 A61K39/12 A61K48/00 A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CROOKS AJ, LEE JM, EASTERBROOK LM, TIMOFEEV AV, STEPHENSON JR: "The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell"</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 75, no. 12, décembre 1994 (1994-12), pages 3453-3460, XP002132937</p> <p>cité dans la demande</p> <p>page 3459, colonne 1, alinéa 3</p> <p style="text-align: center;">— -/-</p>	<p>11-16, 19,20</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01620

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	A FALCONAR ET AL: "Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein" ARCHIVES OF VIROLOGY, US, NEW YORK, NY, vol. 137, no. 3/04, 1994, pages 315-326-326, XP002101238 ISSN: 0304-8608 cité dans la demande le document en entier	12-16
X	FALCONAR AK, YOUNG PR: "Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 72, no. 4, avril 1991 (1991-04), pages 961-965, XP000890192 le document en entier	16
A	WO 93 22440 A (TAN BOON HUAN ;YAP EU HIAN (SG); CHAN YOW CHEONG (SG); FU JIANLIN) 11 novembre 1993 (1993-11-11) page 5, ligne 14 -page 6, ligne 2 exemples 6-9 revendications 9-11,16,17	1-10,16
A	EP 0 402 116 A (IMMUNO AG) 12 décembre 1990 (1990-12-12) revendications 1-6	11-20
A	FALCONAR AK, YOUNG PR: "Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 30, no. 3, décembre 1990 (1990-12), pages 323-332, XP000879370 cité dans la demande le document en entier	11-16, 19,20
A	JACOBS SC, STEPHENSON JR, WILKINSON GW: "High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 4, avril 1992 (1992-04), pages 2086-2095, XP000884360 cité dans la demande le document en entier	11-16, 18-20

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01620

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>FLAMAND M, CHEVALIER M, HENCHAL E, GIRARD M, DEUBEL V: "Purification and renaturation of Japanese encephalitis virus nonstructural glycoprotein NS1 overproduced by insect cells" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 6, no. 4, août 1995 (1995-08), pages 519-527, XP000879369 le document en entier</p>	11,16, 19,20
A	<p>HALL R A ET AL: "Immunoaffinity purification of the NS1 protein of Murray Valley encephalitis virus: selection of the appropriate ligand and optimal conditions for elution." JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, (1991 APR) 32 (1) 11-20., XP000890099 le document en entier</p>	11,16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01620

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9322440 A	11-11-1993	AT 161048 T	15-12-1997
		AU 679179 B	26-06-1997
		AU 4257593 A	29-11-1993
		CA 2134666 A	11-11-1993
		DE 69315689 D	22-01-1998
		DE 69315689 T	02-04-1998
		EP 0638122 A	15-02-1995
		S6 47384 A	17-04-1998
EP 0402116 A	12-12-1990	US 6017535 A	25-01-2000
		AT 143373 T	15-10-1996
		CA 2018332 A	06-12-1990
		CS 9002806 A	12-11-1991
		DD 297997 A	30-01-1992
		DE 69028658 D	31-10-1996
		DE 69028658 T	06-03-1997
		HU 54306 A	28-02-1991
		JP 3151878 A	28-06-1991
		NO 902491 A	07-12-1990
		SK 277781 B	05-01-1995